

# イネばか苗病の育苗期間中における感染動態および防除技術の開発

著者	越智 昭彦
号	54
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1192号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00123609">http://hdl.handle.net/10097/00123609</a>

おち あきひこ

氏名（本籍地） 越 智 昭 彦

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 1192 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 30 年 3 月 27 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科応用生命科学専攻

論 文 題 目 イネばか苗病の育苗期間中における感染動態および防除技術の開発

博士論文審査委員 （主査）教 授 高 橋 英 樹

教 授 西 尾 剛

准教授 早 川 俊 彦

## 論文内容要旨

# イネばか苗病の育苗期間中における感染動態および防除技術の開発

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

越智昭彦

指導教員 高橋 英樹 教授

## 第一章 序論

水稻の主要病害の一つであるばか苗病は糸状菌性の種子伝染性病害である。水稻の育苗時における本病の典型的な病徴は、病原体の *Fusarium fujikuroi* が産生するジベレリンに起因する茎葉の異常徒長である。ばか苗病による減収率は国内で 20～50%と報告されているが (Webster & Gunnell, 1992)、特に問題となるのは育苗時における発病である。水稻の生産現場では本病の罹病苗を移植しないよう指導されており、本病が多発した場合は育苗箱単位での廃棄および健全苗の再購入などを要する。よって集約的な育苗がおこなわれる大型施設では特に経済的な被害が大きく、重要な病害として認識されている。ばか苗病に対する最も一般的な防除法は化学合成農薬による種子消毒である。一方で、近年の環境保全型農業の普及拡大をうけ、農薬成分の使用回数に制約のある有機栽培などでは、代替技術として温湯浸法が普及している。温湯浸法は 60℃の湯に種子を 15 分間浸漬する熱殺菌の手法として開発された (早坂ら, 1999)。現在では温湯浸法は農薬を用いない種子消毒法として基幹技術となっているが、ばか苗病を対象とした防除において複数の課題が生じている。この温湯浸法に関連する課題のうち、ここでは以下の 4 点を研究対象とした。

1 点目の課題は、温湯浸法を採用している育苗施設におけるばか苗病の多発である。近年、温湯浸法の普及に伴い、特定の育苗施設で例年ばか苗病が多発する事例が報告されている (笹原, 2013)。一方で、これら育苗施設におけるばか苗病の感染動態には不明点が多く、育苗時における有効な防除対策は構築されていない。そこで、第二章では温湯浸法を採用している育苗施設のうち、過去にばか苗病が多発した施設を対象とし、病原体の感染が生じている具体的な育苗工程および感染源の特定を試みた。

2 点目の課題は温湯浸法の補完防除技術の開発である。上述のとおり、温湯浸法はばか苗病に対して 60℃で 15 分間の処理を条件として開発されたが、汚染種子に対する殺菌強度が低い場合 (50℃、10 分間)に病原体が残存することが報告されている (早坂ら, 1999)。一般的な生産現場では低温の種子を一度に大量処理することから、種子消毒時の湯温の低下による防除効果の低減が懸念されている。ばか苗病は種子消毒が不十分な場合に多発するため (林ら, 2002)、生産現場からは温湯浸法を補完する新たな種子消毒技術が求められている。そこで、第三章では生物学的および化学的な除染作用 (Laroussi *et al.*, 2000)、消毒作用 (Shimizu *et al.*, 2010)および細胞の活性作用 (Sasaki *et al.*, 2014)を持つ低温大気圧プラズマを殺菌源とした、温湯浸法の補完防除技術の開発を試みた。

3 点目の課題は温湯浸法のコスト低減である。温湯浸法は 1 回当たりの種子量が処理水槽の容量に制限され、その処理には 10 分間以上の時間を要する。これら処理能力の制約は、種子消毒業務の長期化および人件費の増加要因となっている。さらに、消毒後の種子を長期間貯蔵する大型施設では、種子発芽率の低減を回避するため、

温湯浸法後に脱水および乾燥工程を要し、さらにコストが増加する (洞口ら, 2008)。そこで、第四章では安価な温湯浸法の代替技術として、過熱水蒸気を利用した種子消毒技術の開発を目的とした。過熱水蒸気は熱伝導性が高く、焙煎、殺菌、乾燥等の作用があり (伊與田ら, 2014)、これまでにばか苗病防除への適応性について複数の知見が得られている (越智ら, 2013、越智ら, 2014、越智ら, 2015、野田ら, 2015)。第四章第一節では、この過熱水蒸気を利用した種子消毒の実用性を検討するため、試作された実用機 (野田ら, 2015) について、ばか苗病に対する殺菌効果および水稻の苗生育に与える影響を検討した。

4 点目の課題は、育苗工程の浸種および催芽期間中の追加防除法の開発である。熱を殺菌源とする温湯浸法は、農薬と異なり消毒後の種子は病原体の感染に対して無防備であることから、浸種および催芽時の浸漬水を介した感染が課題となっている (笹原, 2013、藤ら, 2015)。また、病原体に汚染した粃殻、米ぬかおよび粉じんなど、不衛生な育苗環境に由来した感染が疑われており (藤, 2013)、浸種および催芽時の衛生管理手法が求められている。そこで、第四章第二節では浸種および催芽時の種子の浸漬水槽に、UV 照射またはフィルターろ過の防除機構を追設し、これら衛生管理の防除効果および種子発芽への影響を調査した。なお、本装置の防除機作は、UV 照射に由来するヒドロキシラジカルの有機物分解能 (Peng *et al.*, 2015) および UV 光が有する有機物分解能 (Haider, 2002)、またはろ過精度 1  $\mu\text{m}$  のフィルターによる病原体の物理的な除去である (Karov *et al.*, 2009)。

## 第二章 育苗期間におけるばか苗病の感染動態

第二章において、まず、病原体の感染が生じている育苗工程を同定した (第一節)。次に、出芽工程における感染源として疑われる育苗箱 (第二節) および育苗器 (第三節) について、病原体の汚染の有無を調査した。

### 第一節 各育苗工程におけるばか苗病の感染調査

初めに、過去にばか苗病の多発事例があり、種子消毒に温湯浸法を採用している育苗施設を対象とし、病原体の感染が生じる育苗工程の同定をおこなった (表 1)。調査地点の各育苗工程の開始時に、育苗ステージを同期した健全種子または苗を持ち込み、当該育苗工程を経過させた後に本検体を回収し、病原体の感染の有無を調査した。検体からの病原体検出およびその菌株の単離には *Fusarium* 属菌の選択培地 (Nishimura, 2007) を用いた。単離菌株の同定および病原性確認は、*F. fujikuroi* の種同定に有用な *TEFI- $\alpha$*  領域の PCR 増幅および相同性検索 (図 2)、水稻種子への接種試験および同苗からの菌株再分離 (図 3) で実施した。2013 年および 2014 年は、育苗工程を浸種、催芽、出芽から 2.5 葉期までの 3 つに分割して調査し、いずれの地点でも出芽から 2.5 葉期までの育苗期間に病原体が感染することを明らかにした (表

2)。さらに 2015 年は、育苗工程を浸種、催芽、出芽、出芽後から 2.5 葉期までの 4 つに分割し、調査した 3 地点のいずれでも出芽時に感染が生じることを確認した (表 2)。その他にも 1 地点で出芽後から 2.5 葉期の工程でも病原体の感染を確認した (表 2)。以上のことから、ばか苗病の感染はいずれの育苗工程でも生じ、特に出芽工程は防除上特に重要であることが明らかとなった。また、出芽工程では汚染種子以外の感染源が存在することが推察されることから、次節において、本工程における感染源の同定を試みた。

## 第二節 播種前の育苗箱からのばか苗病菌の検出

出芽時の感染源として、本工程から使用される農業資材である育苗箱の汚染が疑われた。そこで、第一節の調査と並行して、各調査地点で管理している任意の育苗箱について病原体の汚染の有無を調査した。播種前の育苗箱の表面を拭取ったペーパータオルを接種した生物検定では (図 4)、いずれの地点からも *F. fujikuroi* が単離され (図 5、図 6)、調査した育苗箱の 40%以上が病原体に汚染していることを明らかにした (表 3)。*F. fujikuroi* は常温下の土壌中または刈り株残渣中で 1 年以上生存することから (Sunder *et al.*, 1998)、前作でばか苗病が発生した育苗箱は、その表面上に病原体が残存し、翌年の出芽工程で感染源となる可能性が示唆された。次節では出芽工程のもう一つの感染源として懸念される育苗器について、病原体汚染の有無を調査した。

## 第三節 出芽後の育苗器からのばか苗病菌の検出

育苗器は出芽に用いる農業資材のひとつで、大量の育苗箱を同時に加温処理 (30℃、24 時間程度)する装置である。本装置の一般的な機構は密閉した空間を蒸気加温するもので、本装置が病原体で汚染していた場合、出芽工程の感染源となる可能性がある。そこで本節では第二節と同様に、出芽処理直後の育苗器の表面を拭取ったペーパータオルを接種した生物検定を実施した。調査の結果、いずれの地点でも育苗器の内側表面から病原体が検出された (図 7)。ここで検出された病原体の由来は不明であるが、病原体の存在下で出芽処理が実施されたことが明らかとなり、育苗器も防除が必要な資材であると考えられた。

## 第三章 温湯浸法の補完防除としてのプラズマ照射の実用性検定

第三章では、温湯浸法の新たな補完防除法として、プラズマ照射のばか苗病防除における実用性を検討した (第一節)。

### 第一節 各育苗工程におけるばか苗病の感染調査

本試験のプラズマ照射には、東北大学工学研究科金子研究室で試作された装置を用いた (図 8)。生産現場で懸念されている処理温度の低い温湯浸法 (50℃、10 分

間)にプラズマ照射を体系処理したところ、水稻種子の発芽率および苗生育に影響は認められず (図 9)、処理後種子におけるばか苗病の発病苗率および発病程度を低減することを明らかにした (図 10)。よって、温湯浸法と本プラズマ照射の体系防除の実用性が明らかとなった。

本プラズマ照射の防除機作について調査したところ、プラズマ照射前の種子を蒸留水に浸漬 (25℃、10 分間)した場合に、病原体の生育抑制効果が認められた (図 11)。さらに、本効果はプラズマ照射の時間に依存し、長時間曝露することで高い効果が得られることを明らかにした (図 11)。また、蒸留水の浸漬およびプラズマ照射をおこなった種子では、種子内に過酸化水素の蓄積が確認されたことから (図 12)、プラズマ照射の防除機作は、種子内の  $H_2O$  がイオン化して産生した、過酸化水素を含む活性酸素種に由来することが推察された。今後の検討が必要であるが、プラズマ照射による活性酸素種の産生作用は植物の免疫システムを強化することが知られており (Torres *et al.*, 2006)、本手法はばか苗病以外の広範な病原体への適用が期待される。

#### 第四章 温湯浸法の代替技術および育苗工程の衛生管理技術の開発

第四章においては、温湯浸法の代替技術として、過熱水蒸気の熱を殺菌源として利用する種子消毒法の実用性検証 (第一節)および浸種、催芽時の種子の浸漬水を UV 照射またはフィルターろ過で衛生管理する防除技術の開発をおこなった (第二節)。

##### 第一節 過熱水蒸気を利用した温湯浸法の代替技術

本試験では実用機として試作された、過熱水蒸気を殺菌源とする 1 時間あたり 1kg の種子消毒が可能なフィーダ方式 4 号機 (野田ら, 2015)について、実証試験をおこなった (図 13)。本装置を用いた所定の蒸気処理は、ばか苗病に対して温湯浸法と同等の防除効果を示した (図 14)。また同処理による水稻の苗生育への影響は実用規模の試験でも認められず、(図 15)、本装置の実用性が明らかとなった。本装置のランニングコストは温湯浸法の 5 割以下で、ばか苗病以外の水稻種子伝染性病害虫に対する防除効果は、温湯浸法と同等以上であることが報告されている (野田ら, 2015)。また、本法は温湯浸法と異なり、消毒処理の際に種子の吸水を伴わないことから、貯蔵中の種子がばか苗病に再感染するリスクの低減 (井田ら, 2014)、および温湯浸法が不適とされる糯品種にも適用の可能性が示唆されている (越智ら, 2013)。以上より、本法は温湯浸法の代替技術として有用な種子消毒技術であると考えられる。

##### 第二節 種子浸漬水槽の衛生管理による感染抑制技術の開発

本試験では任意の温度調節が可能な 15 L 容の循環式水槽に、種子の浸漬水の衛生管理機構として、UV 照射試作機 (テクノオリオカ株式会社)または、ろ過精度が 1

μm のフィルターをそれぞれ追設し (図 16)、これらの機構によるばか苗病防除の実用性について調査した。本水槽の浸漬水をばか苗病の孢子懸濁液 ( $1 \times 10^5$  個/mL) に置換し、水稻の健全種子を連続的に浸種 (10℃、7 日間) および催芽 (30℃、24 時間) したところ、無処理では約 99% の種子が病原体に感染したのに対し、UV 照射試作機または 1 μm フィルターの衛生管理処理はいずれも、病原体の感染を完全に防除した (表 6)。また、いずれの処理でも種子の発芽率の低減は認められず、ばか苗病防除への実用性が明らかとなった (表 7)

## 第五章 結論

本研究において、種子消毒に温湯浸法を実施している育苗施設では、1) ばか苗病の感染は育苗工程のいずれでも生じ、特に出芽は全調査地点に共通する感染工程であることを明らかにした。また、2) いずれの調査地点でも、育苗箱および育苗器が病原体に汚染していることを明らかにし、これらの資材が出芽工程の感染源である可能性が示唆された。

水稻種子における温湯浸法とプラズマ照射との体系処理は、1) 水稻の種子発芽に影響することなく、2) 病原体の生育抑制効果、水稻の発病苗率および発病程度の低減効果があることを明らかにし、種子消毒技術としての実用性を確認した。3) 本プラズマ照射は蒸留水に浸漬した水稻種子内に過酸化水素の蓄積を伴うことから、ばか苗病に対する防除機作は、プラズマ照射に由来する活性酸素種の産生によるものと推察された。

過熱水蒸気を利用した水稻種子消毒装置 (フィード方式 4 号機) の実用性を検討したところ、1) 所定の蒸気処理はばか苗病に対して温湯浸法 (60℃、10 分間) と同等の防除効果があること、2) 処理後種子の苗生育に影響しないことをそれぞれ明らかにし、本装置の実用性を確認した。

UV 照射試作機またはフィルターろ過による浸種および催芽時の浸漬水の衛生管理処理は、1) ばか苗病の孢子懸濁液中で浸種および催芽を連続処理した際的水稻種子への感染を防除し、2) 本処理後の種子発芽にも影響しないことを明らかにした。

本研究で得られたばか苗病の防除に関連した知見を体系化すると、水稻の種子消毒から浸種および出芽までの連続した防除が可能となる。すなわち、温湯浸法とプラズマ照射との体系による種子消毒、UV 照射またはフィルターろ過による浸種および催芽時の感染防除、育苗箱および育苗器の消毒による出芽時の感染源除去である。このうち、温湯浸法とプラズマ照射との種子消毒体系は、将来的に温湯浸法を過熱水蒸気に代替することで低コスト化が期待される。この育苗体系の実用にはさらなる技術開発等を要するが、生産現場から期待されている環境保全型農業の継続および水稻の安定生産に寄与するものと考えられる。



## 引用文献

- 藤晋一. 2013. 植物防疫. 67: 223-227.
- 藤晋一, 他. 2015. 秋田県大ウェブジャーナル B 2. 181-186.
- Haider, T. *et al.* 2002. Water Res. 36: 25-32.
- 早坂剛, 他. 1999. 日植病報. 65: 667.
- 林かずよ, 他. 2002. 宮城古川農試報. 3: 137-147.
- 井田陽介, 北澤健. 2014. 滋賀農研報. 52: 41-49.
- 伊與田浩志, 井上保. 2014. 冷凍. 1045: 13-18.
- Karov, I. *et al.* 2009. Proc. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad. 116: 175-182.
- Laroussi M. *et al.* 2000. IEEE TRPMS. 28: 184-188.
- Nishimura, N. 2007. J. Gen. Plant Pathol. 73: 342-348.
- 野田崇啓, 他. 2015. 農業食料工学会誌. 77: 371-383.
- 越智昭彦, 他. 2013. 北日本病虫研報. 64: 29-34.
- 越智昭彦, 野田崇啓. 2014. 植物防疫. 68: 466-471.
- 越智昭彦, 他. 2015. 北日本病虫研報. 66: 13-17.
- Peng, Z. *et al.* 2015. Atmos. Meas. Tech. 8: 4863-4890.
- 笹原教子. 2013. 宮城古川農試報. 11: 85-92.
- Sasaki S. *et al.* 2014. Appl. Phys. Express. 7, 026202, 1-4.
- Shimizu T. *et al.* 2010. Plasma Processes. Polym. 7: 288-293.
- Torres MA. *et al.* 2006. Plant Physiol. 141: 373-378.
- Webster RK, Gunnell PS, 1992. Compendium of Rice Diseases. St Paul, MN, USA: APS Press.

表 1. 調査地点および調査育苗工程

調査年	調査地点	調査育苗工程				
		浸種 <sup>1)</sup>	催芽 <sup>2)</sup>	出芽～育苗 <sup>3)</sup>	出芽 <sup>4)</sup>	育苗 <sup>5)</sup>
2013	A	○	○	○	-	-
	B	○	○	○	-	-
	C	○	○	○	-	-
	センター	○	○	○	-	-
2014	A	○	○	○	-	-
	B	○	○	○	-	-
	C	○	○	○	-	-
	センター	○	○	○	-	-
2015	A	○	○	-	○	○
	B	○	○	-	○	○
	D	○	○	-	○	○
	センター	○	○	-	○	○

○:調査を実施した育苗工程, -:未調査,センター:山形県農業総合研究センター (ばか苗病の汚染の無い対照区), <sup>1)</sup>浸種開始～浸種終了時, <sup>2)</sup>催芽開始～催芽終了時, <sup>3)</sup>出芽開始～本葉 2.5 葉期, <sup>4)</sup>出芽開始～出芽終了時, <sup>5)</sup>育苗開始～本葉 2.5 葉期. 調査地点の各育苗工程の開始時に, 育苗ステージを同期した健全な水稻種子または苗を持ち込み, 当該工程の完了時に本検体を回収した. 回収した検体は 2.5 葉期まで培養した後, 病原体の感染の有無を調査した. 育苗工程は, 2013, 2014 年は 3 工程 (浸種, 催芽, 出芽～育苗), 2015 年は 4 工程 (浸種, 催芽, 出芽, 育苗, 2015 年)にそれぞれ分割して調査した.

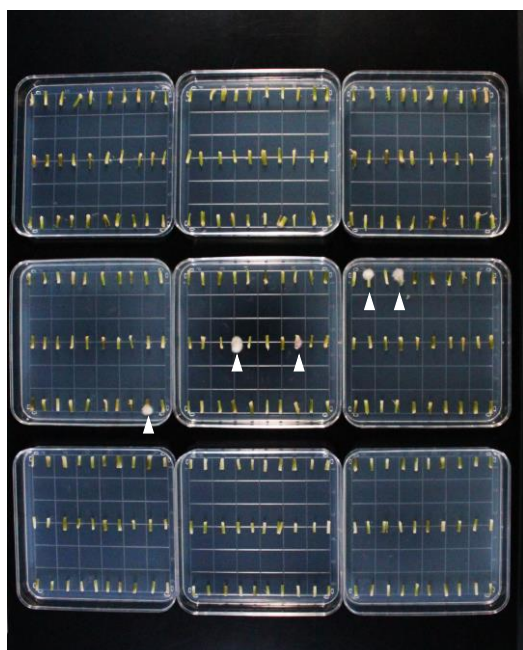


図 1. 選択培地を用いた苗の葉鞘部からの菌株の単離方法

各地点から回収した水稻検体を 2.5 葉期まで育苗後, 苗の葉鞘地際部から 5 mm 程度の切片を作成し, *Fusarium* 属菌の選択培地 (Fo-G2 培地) 上に置床および培養 (25°C, 7 日間) した様子 (図は 2013 年に調査した催芽工程の検体の一部). 矢印は切片から発生した菌株コロニーを示す.

上段:調査地点 A, 中段:調査地点 B, 下段:調査地点 C

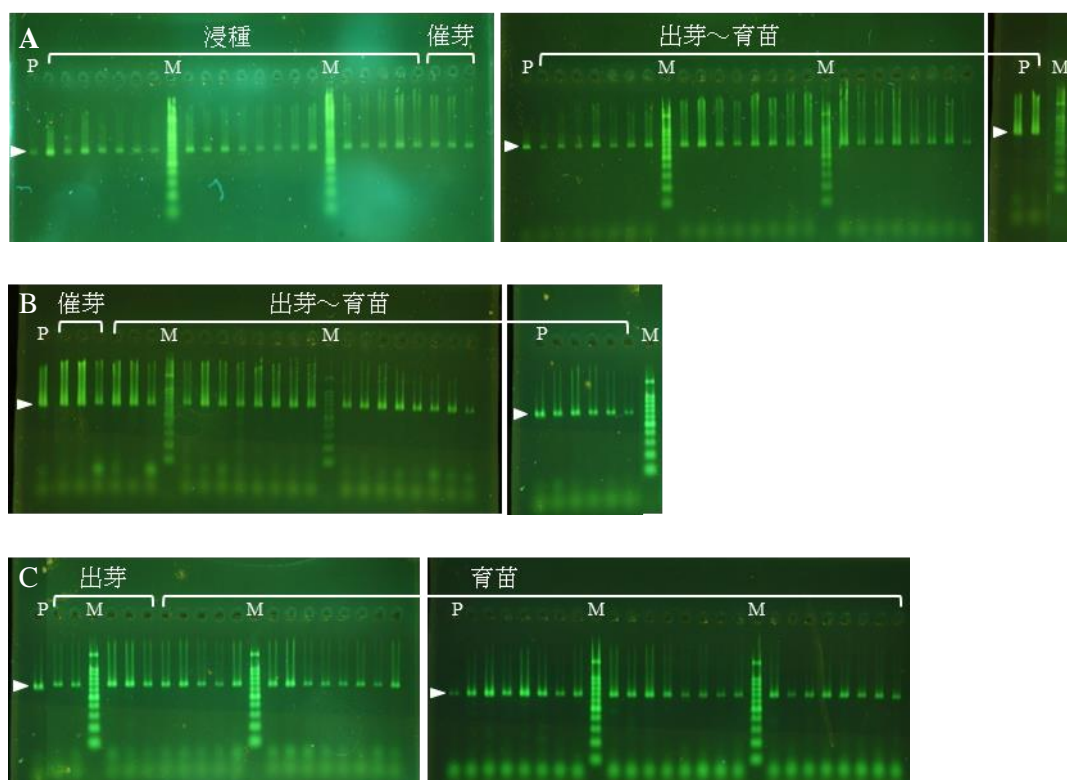


図 2. 単離菌株の *TEF1-α* 遺伝子領域の PCR による増幅および増幅産物の電気泳動による検出

単離菌株より抽出した遺伝子を鋳型とし、既存の *TEF1* および *TEF2* プライマーセットで *F. fujikuroi* の種同定に有用な *TEF1-α* 領域を PCR で増幅した。図は増幅産物の電気泳動による検出を示す。図中の記号等は以下を示す：浸種：浸種開始～浸種終了時まで供試した検体からの単離菌株，催芽：催芽開始～催芽終了時まで供試した検体からの単離菌株，出芽～育苗：出芽開始～本葉 2.5 葉期まで供試した検体からの単離菌株，出芽：出芽開始～出芽終了時まで供試した検体からの単離菌株，育苗：育苗開始～本葉 2.5 葉期まで供試した検体からの単離菌株，P: *F. fujikuroi* Ka52 株 (MAFF244851)，矢頭：662bp，M: DNA マーカー (100 bp DNA Ladder, タカラバイオ株式会社)。

A: 2013 年の調査では、浸種、催芽、および出芽～育苗の 3 工程のいずれでも病原体の感染を確認した (図 A の左から、浸種: 20 菌株 (地点 B), 催芽: 3 菌株 (地点 B), 出芽～育苗: 12 菌株 (地点 A), 9 菌株 (地点 B), 3 菌株 (地点 C))。

B: 2014 年の調査では、催芽および出芽～育苗の 2 工程で病原体の感染を確認した (図 B の左から、催芽: 3 菌株 (地点 B), 出芽～育苗: 7 菌株 (地点 A), 9 菌株 (地点 B), 8 菌株 (地点 C))。

C: 2015 年の調査では出芽および育苗の 2 工程で病原体の感染を確認した (図 C の左から、出芽: 1 菌株 (地点 A), 3 菌株 (地点 B), 1 菌株 (地点 D)。育苗: 36 菌株 (地点 A))。



図 3. 調査地点の各育苗工程を経過した水稻検体から単離した菌株の病原性調査 (各単離菌株の接種苗からの病原体の再分離)

現地の各育苗工程を経過した水稻検体から得た単離菌株について、水稻種子への接種および病原体の再分離により病原性を確認した。各菌株の孢子懸濁液 ( $1 \times 10^6$  個  $\text{mL}^{-1}$ ) を減圧接種した水稻種子を 2.5 葉期まで育苗し、苗の葉鞘基部から 5mm 切片または不発芽種子を採取して検体とした。各検体を表面殺菌後に Fo-G2 培地に置床し、25°C の人工気象器内で 10 日間培養し、*Fusarium* 属菌に特徴的な褐色コロニーの形成の有無で再分離を判定した。検体数は菌株あたり 5 検体とし、培地上で横一列に配置した。図中の記号等は以下のとおり。

浸種: 浸種開始～浸種終了時まで供試した検体から単離した菌株

催芽: 催芽開始～催芽終了時まで供試した検体から単離した菌株

出芽～育苗: 出芽開始～本葉 2.5 葉期まで供試した検体から単離した菌株

出芽: 出芽開始～出芽終了時まで供試した検体から単離した菌株

育苗: 育苗開始～本葉 2.5 葉期まで供試した検体から単離した菌株

括弧内の数値は再分離を確認した菌株数

表 2. 各育苗工程後に回収した水稻種子または苗におけるばか苗病の感染状況

調査年	調査地点	2.5葉期苗の保菌苗率 (%)				
		浸種 <sup>1)</sup>	催芽 <sup>1)</sup>	出芽～育苗 <sup>2)</sup>	出芽 <sup>2)</sup>	育苗 <sup>2)</sup>
2013	A	0	0	12.0	-	-
	B	20.8	3.1	9.0	-	-
	C	0	0	3.0	-	-
2014	A	0	0	7.0	-	-
	B	0	3.0	9.0	-	-
	C	0	0	8.0	-	-
2015	A	0	0	-	0.7	24.0
	B	0	0	-	2.0	0
	D	0	0	-	0.7	0

現地の各育苗工程を経過した水稻種子または苗における病原体の検出状況を示す。2.5 葉期苗の保菌苗率は、現地より回収した検体から、病原性を有する病原体が検出された割合を示す。

<sup>1)</sup>調査苗数: 96 本 (2013 年), 100 本 (2014 年), 150 本 (2015 年), <sup>2)</sup>調査苗数: 育苗箱 1 枚より苗 100 本を抽出 (2013, 2014 年), 育苗箱 3 枚より苗 150 本を抽出 (2015 年)

-: 未調査。ばか苗病の感染は浸種, 催芽, 出芽, 育苗のいずれの育苗工程でも生じることを確認した。また, 出芽～育苗 (2013, 2014 年) および出芽 (2015 年) 工程はいずれの地点でも感染が確認された。



図 4. 生物検定による育苗箱からの病原体の検出

各調査地点から播種前に任意の育苗箱 50 枚を採取し、滅菌したペーパータオルで育苗箱表面を拭き取って 50 mL 容の遠沈管に充填した。本遠沈管に滅菌した育苗培土を添加および健全種子 5 粒を播種し、人工気象器内で 2.5 葉期まで育苗して菌株単離用の検体とした。代表として調査地点 A の試験写真を示す。

左：ばか苗病の発病が見られる検体（調査地点 A）

右：健全な苗の生育（対照区）

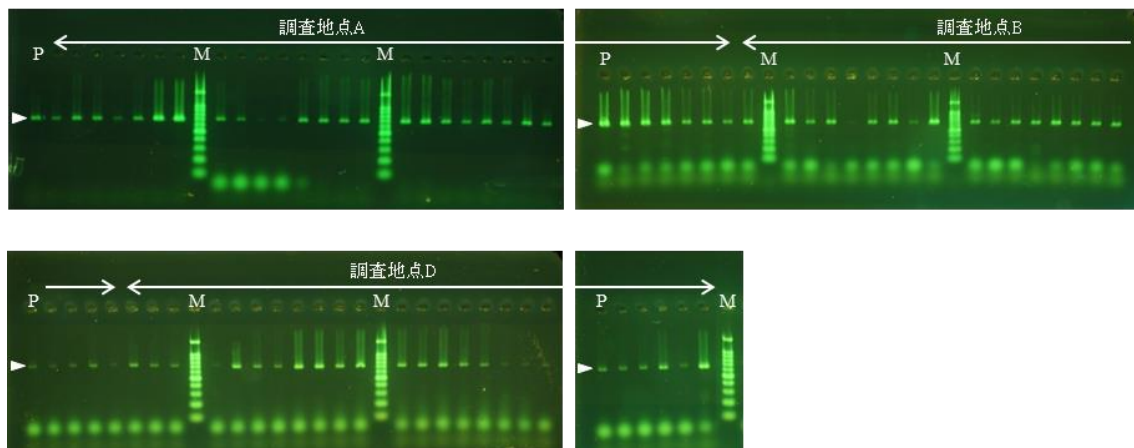


図 5. 育苗箱由来の単離菌株の *TEF1-α* 遺伝子領域を増幅した PCR 産物の電気泳動による検出

各地点の育苗箱から生物検定で得た単離菌株のうち、育苗箱 1 枚あたり任意の 1 菌株を代表菌株として DNA を抽出し、*TEF1-α* 領域を増幅した PCR 産物を電気泳動で検出した。調査地点 A, B, D から得た単離菌株（それぞれ 30 菌株, 21 菌株, 24 菌株）はいずれも、対照の *F. fujikuroi* Ka52 株と同位置にバンドを形成した。図中の記号等は図 2 に準じる。



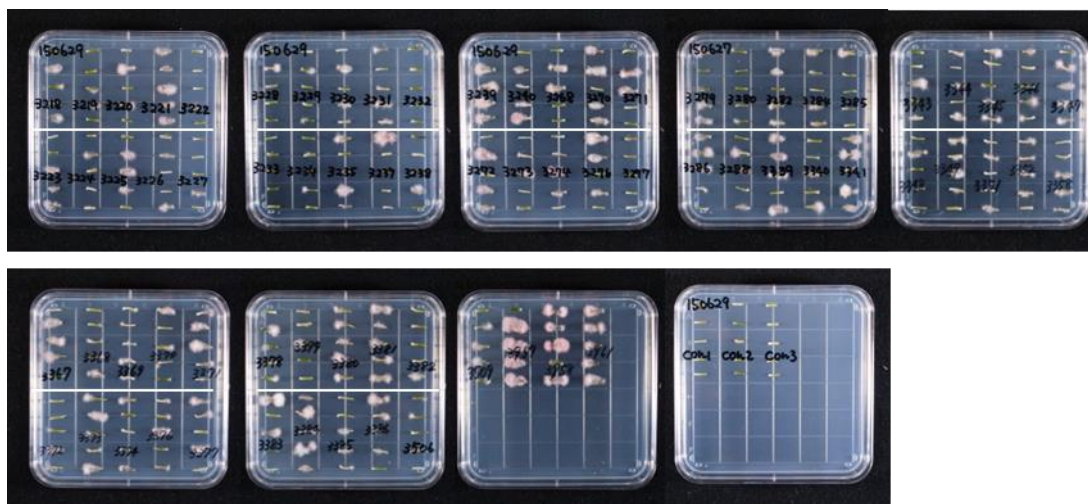


図 6. 育苗箱に由来する単離菌株の病原性調査 (選択培地を用いた接種苗からの菌株再分離)

単離菌株の病原性調査のため、各菌株を接種した水稻苗から同菌株の再分離を試みた。再分離を確認した菌株数は、調査地点 A, B, Dそれぞれで、29 菌株 (3218～3276, 3233 は陰性), 21 菌株 (3277～3358, 3277 は陰性), 24 菌株 (3367～3961)であった。再分離の方法は図 3 に準じる。con1, con2, con3: 健全苗。

調査地点	汚染育苗箱割合 (%)
A	56
B	40
D	48
センター	0

表 3 *F. fujikuroi* による育苗箱の汚染状況  
各調査地点から任意の育苗箱 50 枚を選抜し、生物検定で *F. fujikuroi* が検出された育苗箱数から汚染育苗箱割合を算出した。いずれの地点でも 4 割以上の育苗箱が本病原体に汚染していたことを明らかにした。

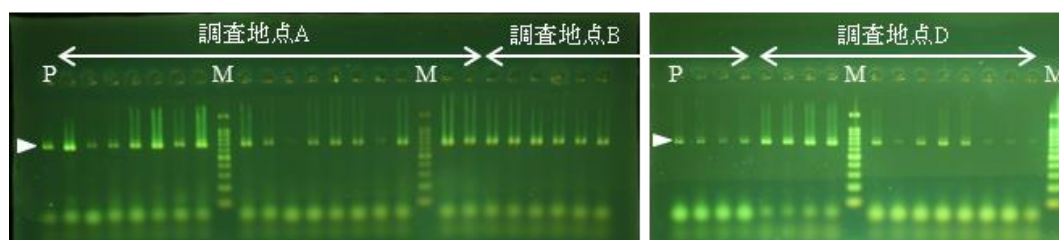


図 7. 育苗器由来の単離菌株の *TEF1-α* 遺伝子領域を増幅した PCR 産物の電気泳動による検出  
出芽処理直後の育苗器の内部表面を拭取ったペーパータオルを育苗培土に接種し、2.5 葉期まで育苗した水稻苗 (地点あたり苗 80 本)から菌株を単離した。本菌株から抽出した DNA を鋳型とし、*TEF1-α* 領域を増幅した PCR 産物を電気泳動で検出した。調査地点 A, B, D から得た単離菌株 (17 菌株, 10 菌株, 11 菌株)は、いずれも対照の *F. fujikuroi* Ka52 株と同位置にバンドを形成した。図中の記号等は図 2 に準じる。

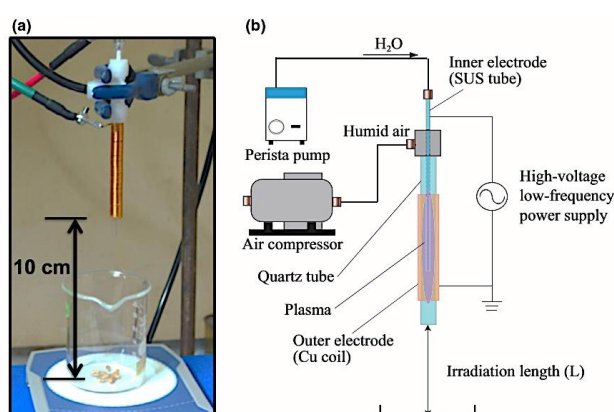


図 8. 大気プラズマ照射装置の概要

プラズマ照射に用いた装置の概要を示す。  
(a) 装置の放電電極部: ビーカー内の種子は互いに重ならないようプラズマ照射した。  
(b) 装置の構成概要: 電極が取り付けられている石英管の底部から水稻種子までの距離は 10 cm に設定した。

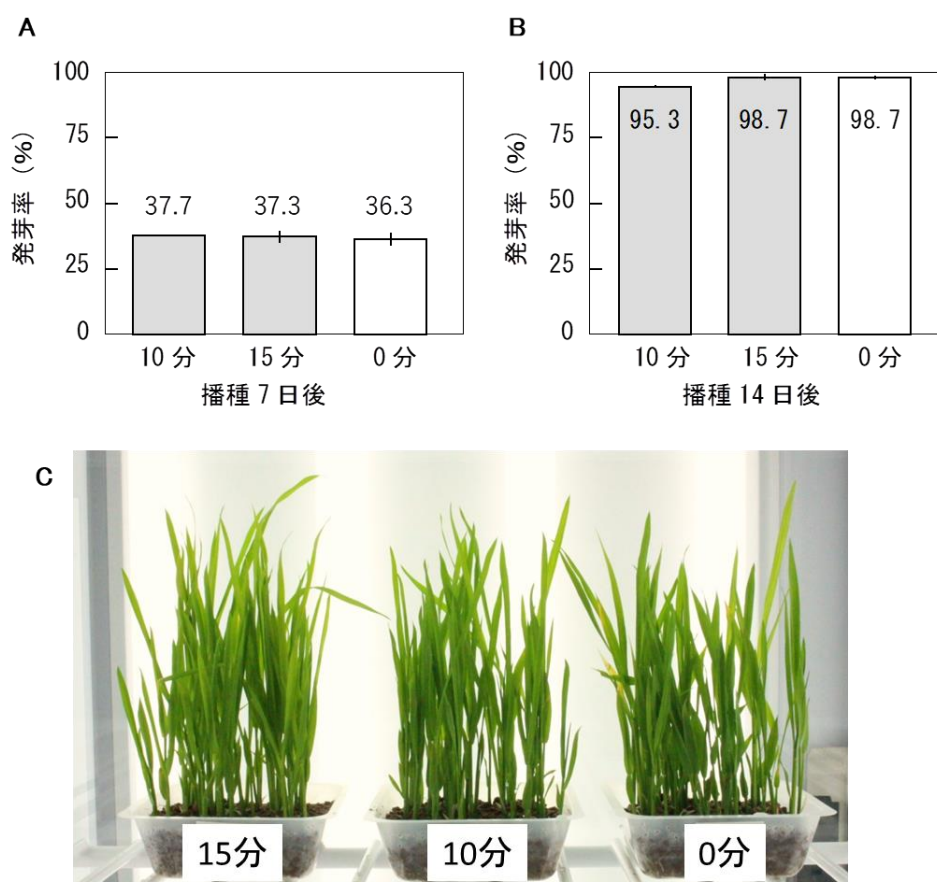


図 9. プラズマ照射した水稻種子の発芽率および育苗状況

温湯浸法 (50℃, 10 分間)後にプラズマ照射 (0 分間, 10 分間, 15 分間)した健全種子を蒸留水で催芽 (28℃, 2 日間, 暗条件)し, ろ紙を敷いて蒸留水を加え, 湿室条件にしたシャーレに播種した. 発芽率は 20℃の人工気象器内で播種 7 日後 (A)および 14 日後 (B)に正常発芽した種子数からそれぞれ算出した. 供試種子数は処理条件あたり 50 粒とし, 試験は 3 反復実施した. 図中の数値は 3 反復平均値, エラーバーは標準誤差, 0 分・10 分・15 分はプラズマ照射時間をそれぞれ示す. 播種 7 日後および 14 日後の種子発芽率は, いずれの処理区間でも有意差は認められなかった (Tukey's post hoc test,  $P < 0.05$ ). C: プラズマ照射および催芽を同様に起こった種子を, 滅菌した育苗培土を充填したポリスチレン容器 (80×80×25 mm)に播種し (50 粒/区), 20℃, 14 時間明期の人工気象器内で 14 日間育苗した. 試験は 3 反復実施し, 代表の 1 試験を示す. 外観上, いずれの処理条件でも苗の生育に異常は認められなかった. 図中の 0 分, 10 分, 15 分はプラズマ照射時間を示す.

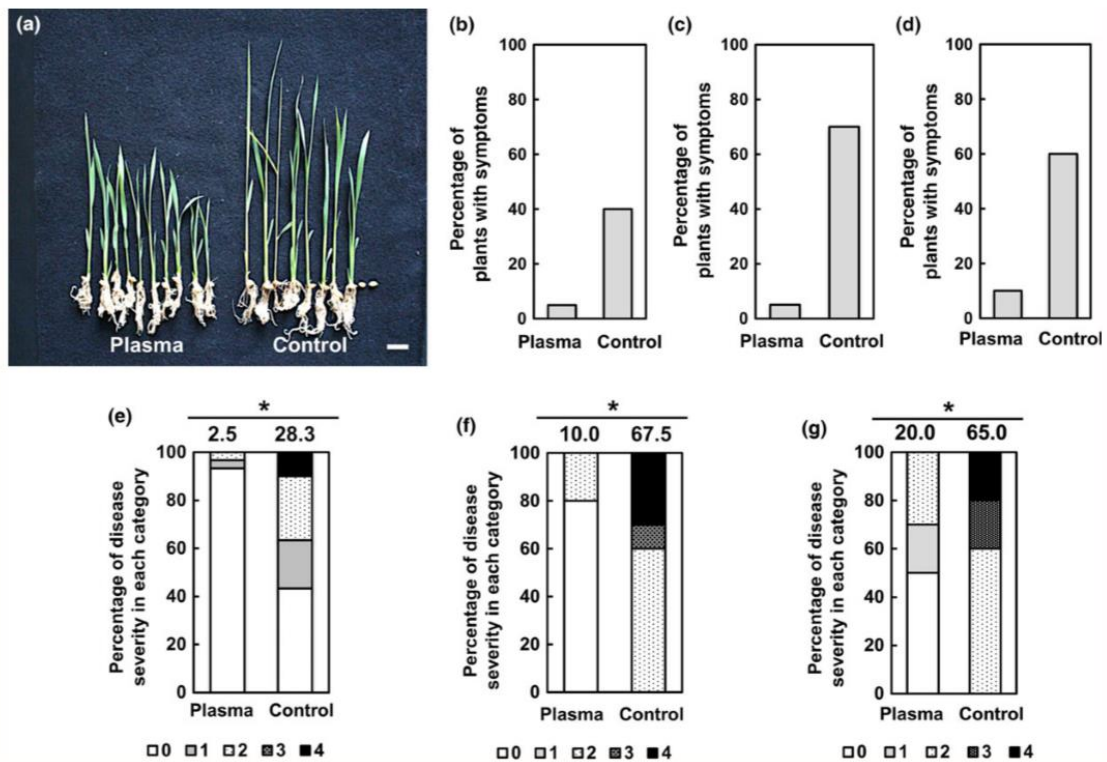


図 10. *F. fujikuroi* の汚染種子への大気プラズマ照射がばか苗病の発病に与える影響  
 50℃の蒸留水で 10 分間浸漬した *F. fujikuroi* の汚染種子にプラズマ照射をおこなった. プラズマ照射 (Plasma)または空気のみを処理 (Control)した供試種子を蒸留水で催芽 (28℃, 2 日間, 暗条件)し, 25℃・14 時間の明条件の人工気象器内で 14 日間培養した水稻苗 (a). 試験区あたりの供試種子数は 10 粒とし, 試験は 3 反復実施した. プラズマ照射 (Plasma)または空気のみを処理 (Control)した *F. fujikuroi* 汚染種子を育苗した苗におけるばか苗病の発病程度を発病率 (b, c, d)および各発病指数に分類される苗の割合で示す (e, f, g). 病徴の程度は 0 (未感染苗), 1, 2, 3 および 4 (重度の感染苗)で分類し, それぞれを図中の白色, 灰色, ドットパターン, 濃い斜線パターンおよび黒色の棒線で示す. 発病度はそれぞれの棒線上に示す (e, f, g). アステリスク(\*)はプラズマ照射 (n=10)と対照 (n=10)との間にウィルコクソンの順位和検定 ( $P<0.01$ )で有意差があることを示す (e, f, g).



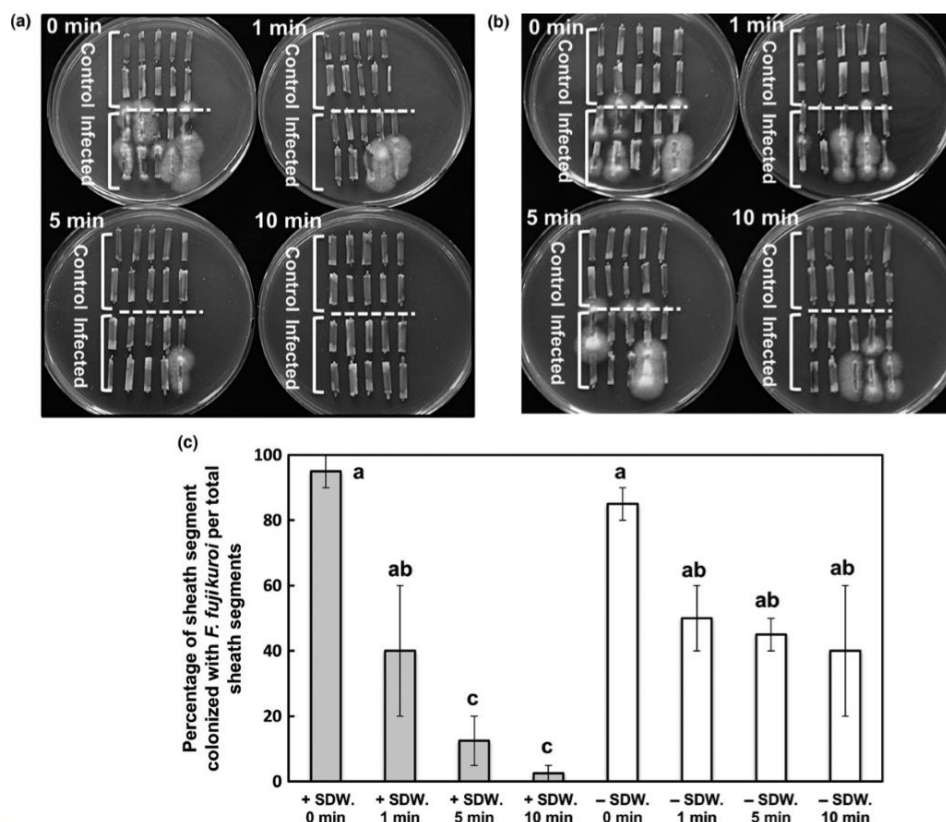


図 11. *F. fujikuroi* の汚染種子を育苗して得た葉鞘切片からの菌株コロニーの形成  
葉鞘切片は、プラズマ照射前に 25℃の蒸留水に浸漬処理 (a)または未処理 (b)の *F. fujikuroi* の汚染種子 (Infected)または健全種子 (Control)を育苗した苗から採取した。プラズマ照射の処理時間は 0, 1, 5, 10 分間とした。汚染種子または健全種子を育苗して採取した各葉鞘切片は、それぞれのシャーレの点線下側に配置した。調査は 3 反復とし、代表的な調査結果を図中に示す (a, b)。 *F. fujikuroi* の汚染種子を育苗して得た葉鞘切片のうち、菌株コロニーを形成した切片数の平均と標準偏差 (エラーバー)を算出した (c)。プラズマ照射 (0, 1, 5, 10 分間)前に蒸留水の浸漬処理または未処理の種子を育苗した検体のデータは、それぞれ“+SDW” (灰色バー)、“-SDW” (白色バー)で示す。菌株コロニーの形成した葉鞘切片数の平均値は、プラズマ照射 (0, 1, 5, 10 分間)前に蒸留水の浸漬処理をした種子と未処理種子との間で統計的に比較した(Tukey's post hoc test ( $P < 0.05$ )). 異なる文字間は菌株コロニーの形成した葉鞘切片の割合に有意差があることを示す。

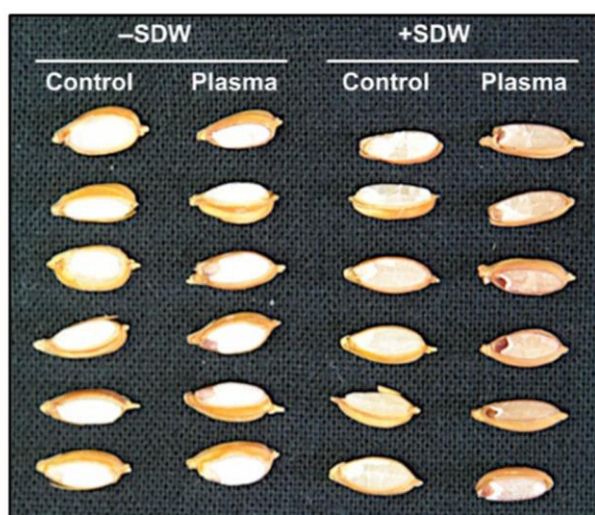


図 12. プラズマ照射により産生した過酸化水素 ( $H_2O_2$ )の組織化学的な検出

25℃の蒸留水に 10 分間の浸漬処理 (+SDW)または未処理 (-SDW)の健全種子に、10 分間のプラズマ照射 (Plasma)または空気のみ処理(Control)した。各照射処理後、垂直方向に薄切りにしたそれぞれの種子を、 $1 \text{ mg mL}^{-1}$  の 3,3'-diaminobenzidine (DAB)に 12 時間浸漬した。暗褐色の染色部は  $H_2O_2$  の産生を示す。

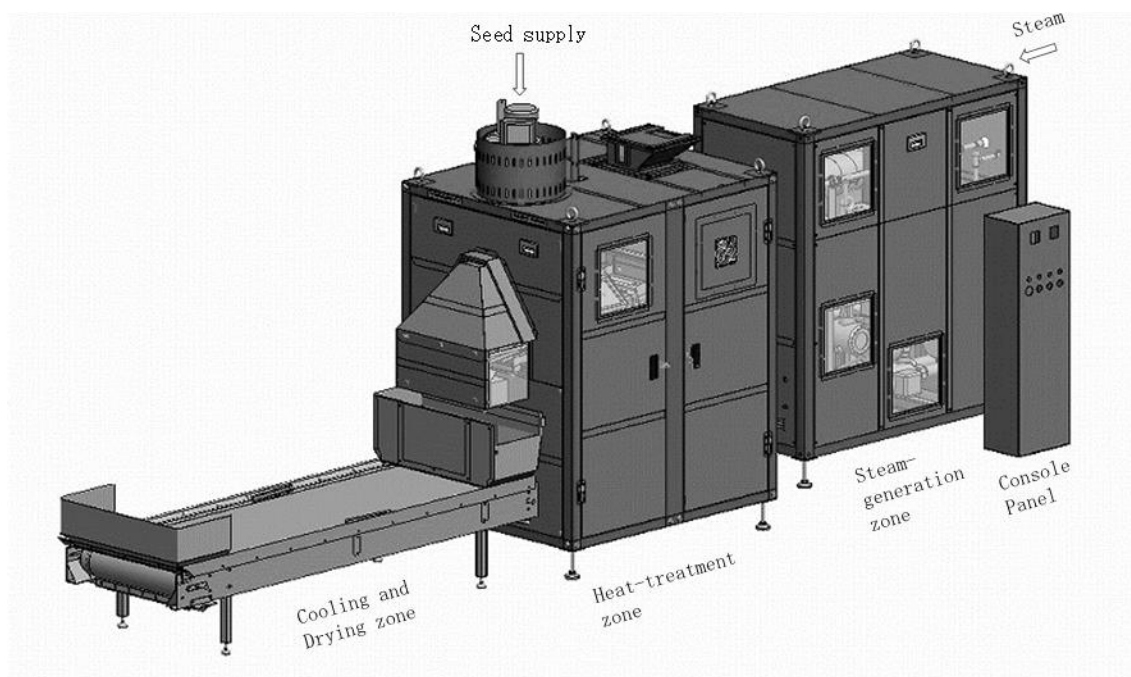


図 13. 過熱水蒸気を利用した種子消毒装置フィーダ方式 4 号機の概要 (生研センター開発)

蒸気生成部 (Steam-generation zone)は気流の温度、湿度および風量を制御して殺菌源となる高温高湿度の混合気体を生成する。熱処理部 (Heat-treatment zone)は蒸気生成部で調整した混合気体を水稻種子に連続的に曝露する部位である。本処理部内での種子の搬送は振動フィーダでおこなわれる。搬送板の一部は多孔板となっており、種子が多孔板上を移動する際に孔内を通過する混合気体に曝露する構造となっている。冷却・乾燥部 (Cooling and Drying zone)では加熱処理で凝縮水が付着し、高温となった種子を冷却および乾燥する。熱処理部から排出された種子は通気性のベルトコンベア上に薄く広がり、常温下での搬送により冷却および乾燥がおこなわれる。

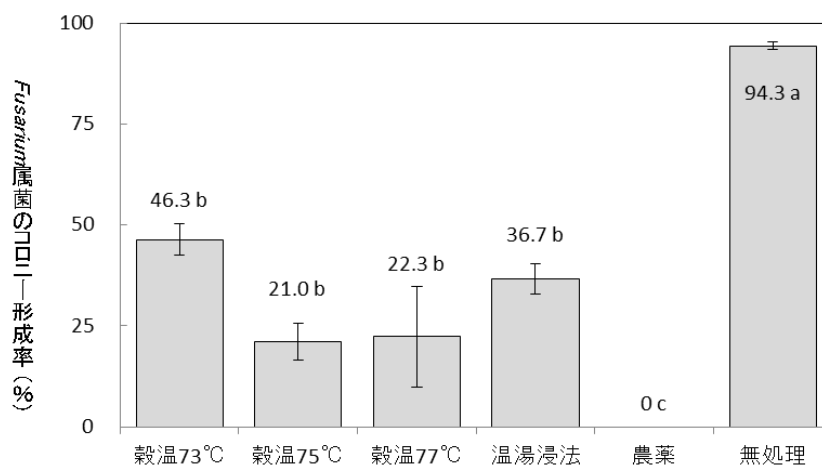


図 14. 蒸気処理による種子消毒の殺菌効果

フィーダ方式 4 号機による熱強度の異なる 3 条件の蒸気処理 (穀温 73℃, 75℃, 77℃)をおこなったそれぞれの供試種子から任意の 50 粒を抽出し、Fo-G2 培地に置床して 20℃で 10 日間培養した。培養後、*Fusarium* 属菌に特徴的な褐色コロニーを形成した種子の割合を計測した。本試験は 3 反復実施し、対照として 60℃で 10 分間の温湯浸漬処理 (温湯浸法)、20 倍で 10 分間のオキシロニック・プロクロラズ水和剤 (農薬)および無消毒 (無処理)の試験区を設けた。図中の数値は 3 反復平均値、エラーバーは標準誤差をそれぞれ示す。アルファベットの同文字間には有意差がないことを示す (Tukey 法,  $p < 0.05$ )。

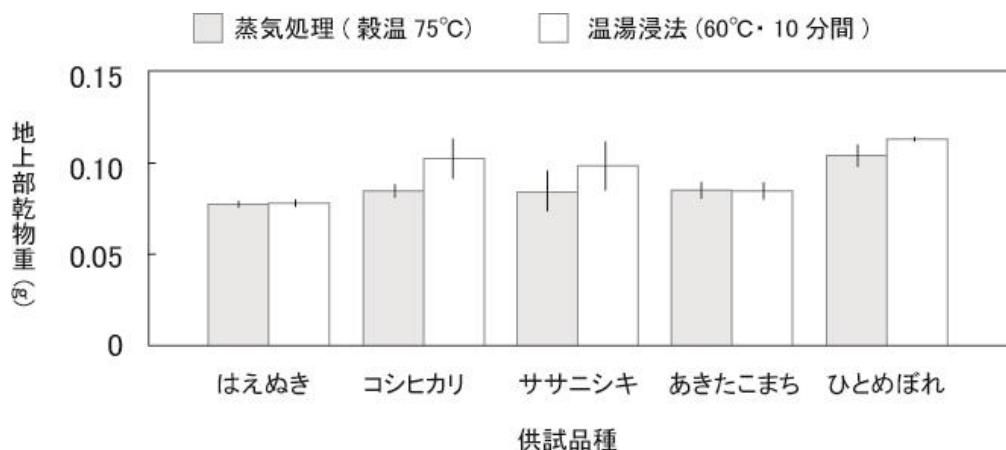


図 15. 育苗開始から 19 日目における苗の地上部乾物重

前年度産の「はえぬき」「コシヒカリ」「ササニシキ」「あきたこまち」「ひとめぼれ」の健全種子 1 kg に穀温 75°C の蒸気処理をそれぞれおこない、浸種 (10°C, 7 日間) および催芽 (30°C, 24 時間) 処理後に、滅菌した育苗培土を充填した育苗箱 (30 cm×60 cm×4cm) に箱当たり任意の種子 120 g を播種した。本育苗箱は出芽 (30°C, 3 日間) 処理し、育苗ハウスで 19 日間のプール育苗条件で管理した。これらの苗から育苗箱あたり任意の苗 30 本について地上部乾物重を測定した。試験は品種あたり 3 反復おこない、温湯浸法 (60°C, 10 分間) を対照とした。グラフは地上部乾物重の 3 反復平均値、エラーバーは標準誤差をそれぞれ示す。いずれの品種でも蒸気処理および温湯浸法とのデータ間に有意差は認められなかった (Tukey 法,  $p < 0.05$ )。

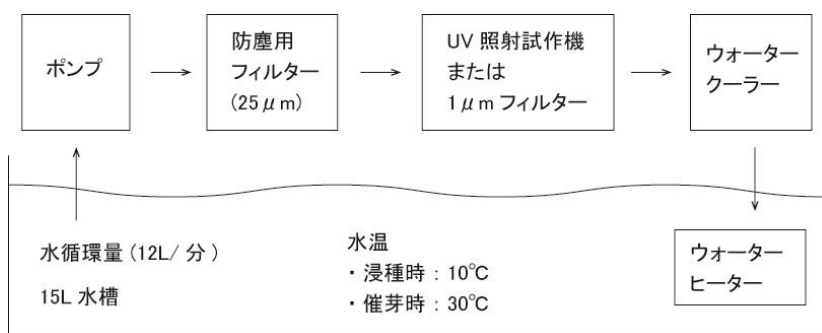


図 16. 衛生管理機構を追設した浸種および催芽水槽の概要

循環式の水槽 (12L/分) で、防除機構にあたる UV 照射試作機または 1μm フィルターは任意に設置が可能。循環系に設置したウォータークーラーおよびウォーターヒーターにより 10°C の浸種および 30°C の催芽が連続的に実施可能。図中の矢印は水循環の流れを示す。

表 6. 浸種および催芽後種子の保菌状況

試験区	保菌種子率 (%)				
	浸種後		催芽後		
UV照射	1.3	± 0.7	0	± 0	0
フィルターろ過	0	± 0	0	± 0	0
無処理	15.3	± 2.7	98.7	± 0.7	

ばか苗病の病原体の胞子懸濁液 ( $1 \times 10^5$  個  $\text{mL}^{-1}$ ) 15L 中で水稻種子を浸種 (浸種後) または浸種から催芽を連続処理 (催芽後) した後の種子保菌状況を調査した. 本試験には同期間中に水槽の循環水 (胞子懸濁液) を UV 照射装置 (UV 照射), 1  $\mu\text{m}$  のフィルター (フィルターろ過) で処理した区および対照の無処理区を設けた. 種子処理量は 3 kg とし, 調査には任意の 50 粒を供試した. 試験は 3 反復おこない, 図中の数値は 3 反復平均値  $\pm$  標準誤差を示す.

表 7. 播種 5 日後および 14 日後の種子発芽率

試験区	種子発芽率 (%)				
	播種5日後		播種14日後		
UV照射	48.7	± 3.4	98.3	± 0.3	
フィルターろ過	49.0	± 3.5	98.0	± 1.0	
無処理	42.3	± 2.0	98.0	± 1	

水道水で浸種 (浸種後) または浸種から催芽を連続処理 (催芽後) した後の種子発芽率を調査した. 本試験には同期間中に水槽の循環水を UV 照射装置 (UV 照射), 1  $\mu\text{m}$  のフィルター (フィルターろ過) で処理した区および対照の無処理区を設けた. 種子処理量は 3 kg とし, 発芽率は任意の 100 粒を抽出して調査した. 試験は 3 反復おこない, 図中の数値は 3 反復平均値  $\pm$  標準誤差を示す. いずれの試験区間にも有意差は認められなかった (Tukey 法,  $p < 0.05$ ).

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名	越智 昭彦
審査委員	主査：教授 高橋 英樹 副査：教授 西尾 剛 准教授 早川 俊彦
学位論文 題目	イネばか苗病の育苗期間中における感染動態および防除技術の開発
論文審査の結果の要旨	
<p>水稻の主要病害であるばか苗病について、生産現場で課題となっている本病の多発生の要因解析および防除法を開発した。本病は病原体の感染が生じる育苗工程が不明で、その対応する防除技術が無い状況にある。また、現行の種子消毒法である温湯浸法は、不十分な防除効果および高コストが課題となっている。そこで本研究者は実用性の高い育苗体系の構築を目指して、ばか苗病の感染動態の解析および複数の防除技術の開発を行った。</p> <p>第二章では、育苗工程におけるばか苗病の感染動態を調査した。現地調査により、本病は浸種、催芽、出芽および苗管理の4工程のいずれでも生じ、特に出芽工程が感染の生じやすい工程であることを明らかにした。また、本工程では現地で使用している農業資材の育苗箱および育苗器が病原体汚染していることを明らかにし、これら資材が出芽時の感染源であることを示した。</p> <p>第三章では、大気圧プラズマを殺菌源とした種子消毒法を開発した。試作機</p>	

<p>を用いたプラズマ照射はばか苗病に対して防除効果有すること、本効果の要因の一つとして種子組織に過酸化水素が生じていることを明らかにした。</p> <p>第四章では、過熱水蒸気を殺菌源とした種子消毒法を開発した。本研究では温湯浸法と比較してランニングコストが半額未満である実用機の実証試験を行い、温湯浸法と同等の実用的な防除効果および正常な苗生育を実証した。</p> <p>第五章では、育苗の4工程のうち、浸種、催芽に使用される種子浸漬水槽の衛生管理技術を開発した。種子の浸漬水に対するUV照射試作機の処理または目合い1 μmのフィルターろ過は、浸種および催芽時の病原体の感染を完全に防除することを示した。</p> <p>本研究で開発した防除技術の体系処理が実現すると、種子消毒においては、温湯浸法はランニングコストが従来の半額未満である過熱水蒸気を用いた消毒法に代替され、さらにプラズマ照射による補完防除により、その防除効果が安定化する。また、育苗工程の浸種および催芽工程では、UV照射またはフィルターろ過による浸漬水の衛生管理が図られる。出芽工程では汚染した育苗箱および育苗器を使用前に消毒することで、感染リスクの低減が可能となる。</p> <p>以上のように、本研究論文では、ばか苗病の防除で不可欠となる感染時期の特定および生産現場のニーズに対応した防除技術を開発した。本研究では、農薬を用いない防除法であることを前提に新技術の開発を実施しており、ここで開発された手法はいずれも、有機農業および減農薬栽培の持続、ひいては環境保全型農業の推進に寄与するものである。よって、審査員一同は、この博士論文は博士（農学）の学位を授与するに値するものであると判断した。</p>	
--	--